

51

Int. Cl. 2:

C 07 J 1/00

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



DE 27 46 298 A 1

11

# Offenlegungsschrift 27 46 298

21

Aktenzeichen: P 27 46 298.2

22

Anmeldetag: 13. 10. 77

43

Offenlegungstag: 19. 4. 79

30

Unionspriorität:

32

33

31

54

Bezeichnung: 4-Androsten-3,17-dion-Derivate, ihre Herstellung und Verwendung

71

Anmelder: Schering AG, 1000 Berlin und 4619 Bergkamen

72

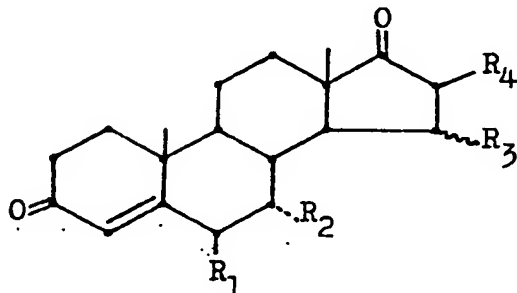
Erfinder: Kieslich, Klaus, Dr., 1000 Berlin

DE 27 46 298 A 1

2746298

P a t e n t a n s p r ü c h e

1, 4-Androsten-3,17-dion-Derivate der allgemeinen Formel I



(I),

worin

$R_1$  ein Wasserstoffatom und  $R_2$  eine  $\alpha$ -ständige Hydroxygruppe oder  $R_1$  und  $R_2$  gemeinsam eine Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung bedeuten und

worin

$R_3$  eine  $\alpha$ -ständige Hydroxygruppe und  $R_4$  ein Wasserstoffatom oder  $R_3$  und  $R_4$  gemeinsam eine Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung oder eine  $\beta$ -ständige Methylengruppe darstellen.

2. 7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion.
3. 4,6,15-Androstatrien-3,17-dion.
4. 7 $\alpha$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4-androsten-3,17-dion.
5. 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,6-androstadien-3,17-dion.
6. Verfahren zur Herstellung von 4-Androsten-3,17-dion-Derivaten der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1,

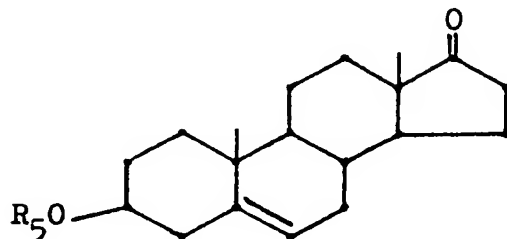
909816/0410

- 2 -

2746298

dadurch gekennzeichnet,

daß man ein 5-Androsten-17-on-Derivat der allgemeinen  
Formel II



(II),

worin

$R_5$  ein Wasserstoffatom oder eine Alkanoylgruppe bedeutet,  
mit einer Mikroorganismen-Kultur der Spezies *Colletotrichum*  
*phomoides* (IFO 5257) fermentiert, und das erhaltene  $3\beta,7\alpha$ ,  
 $15\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on

- a) zur Herstellung von 4-Androsten-3,17-dion-Derivaten der  
allgemeinen Formel I mit  $R_3$  in der Bedeutung einer  
 $\alpha$ -ständigen Hydroxygruppe und  $R_4$  in der Bedeutung eines  
Wasserstoffatoms oder  $R_3$  und  $R_4$  in der Bedeutung einer  
Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung zum  $7\alpha,15\alpha$ -Dihydroxy-4-  
androsten-3,17-dion oxydiert und dieses gegebenenfalls de-  
hydratisiert, oder
- b) zur Herstellung von 4-Androsten-3,17-dion-Derivaten mit  
 $R_3$  und  $R_4$  in der Bedeutung einer  $\beta$ -ständigen Methylengruppe  
mit Acylanhydriden in ein  $3\beta$ -Acyloxy- $7\alpha$ -hydroxy-5,17-andro-  
stadien-17-on überführt und dieses mit Trimethylsulfonium-  
methyld umsetzt, das erhaltene  $3\beta$ -Acyloxy- $7\alpha$ -hydroxy- $15\beta,16\beta$ -

909816/0410

- 3 -

2746298

methylen-4-androsten-3,17-dion verseift und zum 7 $\alpha$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4-androsten-3,17-dion oxydiert und dieses gegebenenfalls dehydratisiert.

7. Verwendung der 4-Androsten-3,17-dion-Derivate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1 als Zwischenprodukte zur Synthese pharmakologisch wirksamer Steroide.

909816/0410

4-Androsten-3,17-dion-Derivate, ihre  
Herstellung und Verwendung

909816/0410

Vorstand: Dr. Herbert Asmis - Dr. Christian Bruhn - Hans-Jürgen Hamann  
Dr. Heinz Hahnse - Karl Otto Mittelstenscheid - Dr. Horst Witzel  
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. Eduard v. Schwarzkoppen  
Sitz der Gesellschaft: Berlin und Bergkamen  
Handelsregister: AG Charlottenburg 93 HRB 283 u. AG Kamen HRB 0061

Postanschrift: SCHERING AG · D-1 Berlin 65 · Postfach 65 03 11  
Postcheck-Konto: Berlin-West 1175-101, Bankleitzahl 100 100 10  
Berliner Commerzbank AG, Berlin, Konto-Nr. 103 7006 00, Bankleitzahl 100 400 00  
Berliner Disconto-Bank AG, Berlin, Konto-Nr. 241/5008, Bankleitzahl 100 700 00  
Berliner Handels-Gesellschaft — Frankfurter Bank —, Berlin,  
Konto-Nr. 14-362, Bankleitzahl 100 202 00

Die Erfindung betrifft neue 4-Androsten-3,17-dion-Derivate der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Zwischenprodukte zur Herstellung von pharmakologisch wirksamen Steroiden.

Die erste Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß Anspruch 6 wird unter den Fermentationsbedingungen durchgeführt, die man üblicherweise zur Hydroxylierung von Steroiden mit Pilzkulturen anwendet.

So kann man beispielsweise in einem konventionellen Nährmedium unter Belüften und Rühren Submerskulturen von *Colletotrichum phomoides* (IFO 5257) anzüchten, diesen Kulturen Substratlösung (geeignete Substratlösungsmittel sind beispielsweise Methanol, Äthanol, Aceton, Glykolmonomethyläther, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxyd) zusetzen, und die Fermentation bis zur Beendigung der Hydroxylierung fortführen.

Die optimale Substratkonzentration, Substratzugabezeit und Fermentationsdauer ist von der Struktur des verwendeten Substrates und von der Wahl der Fermentationsbedingungen abhängig. Diese Größen müssen, wie dies bei mikrobiologischen Steroidumwandlungen allgemein erforderlich ist, im Einzelfall durch Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, ermittelt werden.

Für diese Fermentation eignet sich als Substrat besonders das 3 $\beta$ -Hydroxy-5-androsten-17-on, es ist aber auch möglich, 3 $\beta$ -Acyloxy-5-androsten-17-one der allgemeinen Formel II als Substrate zu verwenden, besonders solche, in denen sich die Acyl-

909816/0410

- 5 -

2746298

oxygruppe von einer n-Alkancarbonsäure mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen (beispielsweise Ameisensäure oder Essigsäure) ableitet.

Das bei dieser Fermentation gebildete  $3\beta,7\alpha,15\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on ist bereits bekannt und wurde von M. Okada (Steroids 6, 1965, 651) durch Hydroxylierung von  $3\beta$ -Hydroxy-5-androsten-17-on mit einer Mikroorganismenkultur der Spezies *Giberella saubinetti* hergestellt. Dieses bekannte Verfahren hat aber den Nachteil, daß das  $3\beta,7\alpha,15\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on in nur sehr geringer Ausbeute als Nebenprodukt erhalten wird. Demgegenüber bietet die erste Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens den Vorzug, daß sie die Herstellung von  $3\beta,7\alpha,15\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on in einer Ausbeute von ca. 70 % ermöglicht. Daß diese mikrobiologische Dihydroxylierung unter Erzielung so hoher Ausbeuten am Verfahrensprodukt durchführbar ist, war für den Fachmann nicht vorhersehbar.

Die sich an die mikrobiologische Verfahrensstufe anschließende Oxydation des  $3\beta,7\alpha,15\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-ons zum  $7\alpha,15\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion gemäß Patentanspruch 6 a erfolgt unter an sich bekannten Bedingungen, beispielsweise mittels Oppenauer-Oxydation, oder besonders vorteilhaft durch Umsetzung mit einer Mikroorganismenkultur der Spezies *Flavobacterium dehydrogenans* unter den für diese Fermentation üblichen Bedingungen. Die sich hieraus gegebenenfalls anschließende Dehydratisierung erfolgt ebenfalls unter an sich bekannten Bedingungen, in dem man zum Beispiel das  $7\alpha,15\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion in einem inerten Lösungsmittel (Benzol,

909816/0410

- 6 -

Vorstand: Dr. Herbert Asmis · Dr. Christian Bruhn · Hans-Jürgen Hamann  
Dr. Heinz Mannse · Karl Otto Mittelstentscheid · Dr. Horst Witzel  
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. Eduard v. Schwartzkoppen  
Sitz der Gesellschaft: Berlin und Bergkamen  
Handelsregister: AG Charlottenburg 93 HRB 283 u. AG Kamen HRB 0061

Postanschrift: SCHERING AG · D-1 Berlin 65 · Postfach 65 03 11  
Postcheck-Konto: Berlin-West 1175-101, Bankleitzahl 100 100 10  
Berliner Commerzbank AG, Berlin, Konto-Nr. 106 7006 00, Bankleitzahl 100 400 00  
Berliner Disconto-Bank AG, Berlin, Konto-Nr. 241/5008, Bankleitzahl 100 700 00  
Berliner Handels-Gesellschaft - Frankfurter Bank -, Berlin,  
Konto-Nr. 14-362, Bankleitzahl 100 202 00

34 PH IV 36718

2746298

Toluol etc.) in Gegenwart von Säuren und/oder wasserbindenden Mitteln (Schwefelsäure, Phosphorsäure, Polyphosphorsäure, p-Toluolsulfonsäure, Molekularsiebe etc.) umgesetzt. Bei dieser Dehydratisierung bilden sich primär Gemische aus 7 $\alpha$ -Hydroxy-4,15-androstadien-3,17-dion und 15 $\alpha$ -Hydroxy-4,7-androstadien-3,17-dion, welche bei weiterer Dehydratisierung das 4,7,15-Androstatrien-3,17-dion bilden.

Das so erhaltene 4,7,15-Androstatrien-3,17-dion ist ein wertvolles Zwischenprodukt zur Synthese pharmakologisch wirksamer Steroide. Es kann beispielsweise unter den in den Anwendungsbeispielen beschriebenen Bedingungen in 17 $\alpha$ -(3-Acetoxypropyl)-7 $\alpha$ -acetylthio-17 $\beta$ -hydroxy-4,15-androstadien-3-on oder 7 $\alpha$ -Acetylthio-3-oxo-4,15-androstadien-[17( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on überführen.

Diese Verbindungen sind Diuretika vom Typ der Aldosteron-Antagonisten.

Die Überführung des 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on in 3 $\beta$ -Acyloxy-7 $\alpha$ -hydroxy-5,17-androstadien-17-on gemäß Verfahren des Patentanspruchs 6 b ist bekannt (Steroids 6, 1965, 651).

Die Methylenierung der Verbindungen erfolgt nach an sich bekannten Methoden, durch Umsetzung mit Dimethylsulfoxoniummethyld in einem aprotischen Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Dioxan oder einem Gemisch aus Dimethylsulfoxid und Tetrahydrofuran, wobei zweckmäßigerweise bei 20 - 40 ° C unter Schutzgas, wie Stickstoff, gearbeitet wird.

809816/0410

- 7 -



2746298

Die Darstellung des Dimethylsulfoxoniummethylds erfolgt zweckmäßigerweise aus Trimethylsulfoxoniumjodid bzw. -chlorid mit einer Base wie Natriumhydrid, Natriumhydroxid, Kalium-tertiärbutylat oder Natriummethylat.

Die erhaltenen 3 $\beta$ -Acyloxy-7 $\alpha$ -hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-5-androsten-3,17-dione werden verseift und unter den bereits beschriebenen Bedingungen zum 7 $\alpha$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4-androsten-3,17-dion oxydiert, welches wie beschrieben zum 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,7-androstadien-3,17-dion dehydratisiert werden kann.

Das so erhaltene 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,7-androstadien-3,17-dion ist ebenfalls ein wertvolles Zwischenprodukt zur Synthese pharmakologisch wirksamer Steroide. Es kann beispielsweise unter den in den Anwendungsbeispielen beschriebenen Bedingungen in den Aldosteron-Antagonisten 7 $\alpha$ -Acetylthio-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3-oxo-4-androsten-[17( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on überführt werden.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

909816/0410

2746298

# I. Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren.

## Beispiel 1

a) Ein 2 l Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Minuten bei 120° C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 3 % Glukose, 1 % Cornsteep liqour, 0, 2 % Natriumnitrat, 0,1 % Kaliumdi-hydrogenphosphat, 0,2 % Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05 % Magnesiumsulfat, 0,002 % Eisen(II)-sulfat und 0,05 % Kaliumchlorid enthält, wird mit einer Lyophilkultur von Colletotrichum phomoides (IFO 5257) beimpft und 72 Stunden bei 30° C auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Mit 200 ml dieser Vorkultur wird dann ein 20 l Fermenter, der mit 15 l eines bei 121° C und 1,1 atü sterilisierten Mediums der gleichen Zusammensetzung wie die Vorkultur gefüllt ist, beimpft. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel wird bei 29 ° C unter Belüftung (10 l/Min.), 0,7 atü Druck und Rühren (220 Umdrehungen pro Minute) 24 Stunden germiniert. 0,9 Liter der Kulturbrühe werden unter sterilen Bedingungen in 14 l eines wie oben sterilisierten Nährmediums gleicher Zusammensetzung überführt und unter gleichen Bedingungen angezüchtet. Nach 12 Stunden wird eine sterilfiltrierte Lösung von 15 g 3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on in 75 ml Dimethylformamid zugesetzt.

Der Ablauf der Umwandlung wird durch dünnschichtchromatographische Analyse der Methylisobutylketon-Extrakte von Fermenterproben verfolgt. Nach vollständiger Umwandlung

909816/0410

- 9 -

Vorstand: Dr. Herbert Asmis · Dr. Christian Bruhn · Hans-Jürgen Hamann  
Dr. Heinz Hannse · Karl Otto Mittelsteneid · Dr. Horst Witzel  
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. Eduard v. Schwartzkoppen  
Sitz der Gesellschaft: Berlin und Bergkamen  
Handelsregister: AG Charlottenburg 93 HRB 283 u. AG Kamen HRB 0081

Postanschrift: SCHERING AG · D-1 Berlin 65 · Postfach 65 03 11  
Postcheck-Konto: Berlin-West 1175-101, Bankleitzahl 100 100 10  
Berliner Commerzbank AG, Berlin, Konto-Nr. 108 7006 00, Bankleitzahl 100 400 00  
Berliner Disconto-Bank AG, Berlin, Konto-Nr. 241/5008, Bankleitzahl 103 700 00  
Berliner Handels-Gesellschaft - Frankfurter Bank -, Berlin,  
Konto-Nr. 14-362, Bankleitzahl 100 202 00

10

2746298

(19 Stunden Kontaktzeit) wird der Fermenterinhalt zweimal mit je 5 l Methylisobutylketon ausgerührt und der Extrakt bei 50° C Badtemperatur im Vakuum eingedampft, wobei bereits größere Anteile des 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-ons auskristallisierten und durch Filtration abgetrennt werden. Das Konzentrat wird zur Trockne eingeeengt, der Rückstand zur Entfernung des Siliconöls mit Hexan gewaschen und aus Aceton umkristallisiert und man erhält 11,4g 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-3-on vom Schmelzpunkt 217 - 218° C.

- b) Ein Glasfermenter mit 20 l Fassungsvermögen wird mit 15 l einer Nährlösung aus 0,3 % Hefeextrakt, 0,5 % Cornsteep liquor und 0,2 % Stärkezucker beschickt, durch halbstündiges Erhitzen auf 120° C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 250 ml einer 2-tägigen Schüttelkolbenkultur von Flavobacterium dehydrogenans (ATCC 13930) beimpft. (Die Schüttelkolbenkultur wird durch Inoculieren von 250 ml des gleichen Mediums mit der Abschwemmung einer 7 Tage alten Schrägagarkultur hergestellt.) Nach 24 stündiger Vermehrung bei 30° C unter Rühren (220 Umdrehungen pro Minute) werden 0,9 l der erzeugten Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen und in einen gleichen Fermenter - beschickt mit 15 l des gleichen Mediums - überführt. Nach 6 Stunden wird eine steriltfiltrierte Lösung von 30 g 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on in 150 ml Dimethylformamid zugesetzt und unter gleichen Bedingungen weitere 18 Stunden fermentiert. Nach beendeter Fermentation wird die Kulturbrühe zweimal mit je 5 l Methylisobutylketon extrahiert. Die ver-

909816/0410

- 10 -

2746298

einigten Extrakte werden im Vakuum eingedampft. Dabei kristallisieren bereits größere Anteile des gebildeten 7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion aus. Das Konzentrat wird schonend eingeeengt, der Rückstand mit Hexan von Siliconöl gewaschen, und aus Essigester umkristallisiert. Die vereinigten Kristallisate betragen 16,8 g 7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion vom Schmelzpunkt 214 - 215° C.

### Beispiel 2

20 g 7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxy-4-androsten-3,17-dion werden in 600 ml Benzol gelöst, mit 4 g p-Toloulsulfonsäure und 20 g Molekularsieb versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren und mehrmaligem Waschen der Benzollösung mit Wasser wird im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand an Silicagel chromatographiert. Das abgetrocknete 4,6,15-Androstatrien-3,17-dion wird aus Aceton umkristallisiert. Schmelzpunkt 191 - 192° C.

### Beispiel 3

- a) Ein 2 l Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Minuten bei 120° C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 3 % Glukose, 1 % Cornsteep liquor, 0,2 % Natriumnitrat, 0,1 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,2 % Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05 % Magnesiumsulfat, 0,002 % Eisen(II)-sulfat und 0,05 % Kaliumchlorid enthält, wird mit einer Lyophilkultur von Colletotrichum phomoides (IFO 5257) beimpft und 72 Stunden bei 30° C auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Mit 200 ml

909816/0410

- 11 -

2746298

dieser Vorkultur wird dann ein 20 l Fermenter, der mit 15 l eines bei 121° C und 1,1 atü sterilisierten Mediums der gleichen Zusammensetzung wie die Vorkultur gefüllt ist, beimpft. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel wird bei 29° C unter Belüftung (10 l pro Minute), 0,7 atü Druck und Rühren (220 Umdrehungen pro Minute), 24 Stunden germiniert. 0,9 Liter der Kulturbrühe werden unter sterilen Bedingungen in 14 l eines wie oben sterilisierten Nährmediums gleicher Zusammensetzung überführt und unter gleichen Bedingungen angezüchtet. Nach 12 Stunden wird eine steriltriftrierte Lösung von 15 g 3 $\beta$ -Hydroxy-5-androsten-17-on in 75 ml Dimethylformamid zugesetzt. Der Ablauf der Umwandlung wird durch dünn-schicht-chromatographische Analyse der Methylisobutylketon-Extrakte von Fermenterproben verfolgt. Nach vollständiger Umwandlung (19 Stunden Kontaktzeit) wird der Fermenterinhalt zweimal mit je 5 l Methylisobutylketon ausgerührt und der Extrakt bei 50° C Badtemperatur im Vakuum eingedampft, wobei bereits größere Anteile des 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-ons auskristallisierten und durch Filtration abgetrennt werden. Das Konzentrat wird zur Trockne eingeeengt, der Rückstand zur Entfernung des Siliconöls mit Hexan gewaschen und aus Aceton umkristallisiert. Die gesammelten Kristallisate betragen 11,4 g 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 217 - 218° C.

- b) 5 g 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Trihydroxy-5-androsten-17-on werden in 60 ml Pyridin gelöst, mit 15 ml Acetanhydrid versetzt und 1 Stunde

909816/0410

- 12 -

2746298

bei 60° C gerührt. Nach Eingießen der Reaktionslösung in 2n Schwefelsäure wurde in Methylenchlorid aufgenommen, mit Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird an Silicagel chromatographiert und man erhält das 3 $\beta$ -Acetoxy-7 $\alpha$ -hydroxy-androsta-5,15-dien-17-on vom Schmelzpunkt 186 - 187° C.

- d) Ein Glasfermenter mit 20 l Fassungsvermögen wird mit 15 l einer Nährlösung aus 0,3 % Hefeextrakt, 0,5 % Cornsteep liquor und 0,2 % Stärkezucker beschickt, durch halbstündiges Erhitzen auf 120° C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 250 ml einer 2-tägigen Schüttelkolbenkultur von *Flavobacterium dehydrogenans* (ATCC 13930) beimpft. (Die Schüttelkolbenkultur wird durch Inoculieren von 250 ml des gleichen Mediums mit der Abschwemmung einer 7 Tage alten Schrägagarkultur hergestellt.) Nach 24 stündiger Vermehrung bei 30° C unter Rühren (220 Umdrehungen pro Minute) werden 0,9 l der erzeugten Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen und in einen gleichen Fermenter - beschickt mit 15 l des gleichen Mediums - überführt. Nach 6 Stunden wird eine sterilfiltrierte Lösung von 7,5 g 15,16 $\beta$ -Methylen-3 $\beta$ -acetoxy-7 $\alpha$ -hydroxy-5-androsten-17-on in 150 ml Dimethylformamid zugesetzt und unter gleichen Bedingungen weitere 18 Stunden fermentiert. Nach beendeter Fermentation wird die Kulturbrühe zweimal mit je 5 l Methylisobutylketon extrahiert. Die ver-

909816/0410

2746298

einigten Extrakte werden im Vakuum eingedampft. Dabei kristallisieren bereits größere Anteile des gebildeten 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-7 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3,17-dion aus. Das Konzentrat wird schonend eingeeengt, der Rückstand mit Hexan von Siliconöl gewaschen, aus Essigester umkristallisiert und man erhält das 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-7 $\alpha$ -hydroxy-4-androsten-3,17-dion.

Beispiel 4

10 g 7 $\alpha$ -Hydroxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4-androsten-3,17-dion werden in 300 ml trockenem Benzol gelöst, mit 2 g p-Toluolsulfonsäure und 10 g Molekularsieb versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren und mehrmaligem Waschen der Benzollösung mit Wasser wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird an Silicagel chromatographiert, wobei das 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,6-androstadien-3,17-dion als Öl erhalten wird.

- 14 -

909816/0410

Vorstand: Dr. Herbert Asmis · Dr. Christian Bruhn · Hans-Jürgen Hamann  
Dr. Heinz Hannes · Karl Otto Mittelstenscheid · Dr. Horst Witzel  
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. Eduard v. Schwartzkoppen  
Sitz der Gesellschaft: Berlin und Bergkamen  
Handelsregister: AG Charlottenburg 53 HRB 283 u. AG Kamen HRB 0061

Postanschrift: SCHERING AG · D-1 Berlin 65 · Postfach 65 03 11  
Postscheck-Konto: Berlin-West 1175-101, Bankleitzahl 100 100 10  
Berliner Commerzbank AG, Berlin, Konto-Nr. 108 7006 00, Bankleitzahl 100 400 00  
Berliner Disconto-Bank AG, Berlin, Konto-Nr. 241/5006, Bankleitzahl 100 700 00  
Berliner Handels-Gesellschaft — Frankfurter Bank —, Berlin,  
Konto-Nr. 14-362, Bankleitzahl 100 202 00

2746298

## II. Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

- a) 1,1 g 4,6,15-Androstatrien-3,17-dion werden in 6 ml Methylenchlorid mit 3,6 ml Äthylenglykol, 2,4 ml Ameisensäuretriäthylester und 50 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und 75 Minuten bei 50° C gerührt. Die Reaktionslösung wird dann mit 0,5 ml Pyridin versetzt, mit Äther verdünnt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird über eine Kieselsäule chromatographiert und man erhält das 3,3-Äthylen-dioxy-4,6,16-androstatrien-17-on als Rohprodukt.
- b) 20 g 3,3-Äthylenedioxy-4,6,15-androstatrien-17-on werden in 280 ml absolutem Tetrahydrofuran mit 4,34 g frisch gepreßtem Lithium versetzt. Dann werden unter Eiskühlung 36 ml 1-Brom-3-dimethoxy-propan innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach 1,5 Stunden Rühren bei Eisbadtemperatur wird vom nicht umgesetzten Lithium abfiltriert und das Filtrat in Eiswasser eingerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wird ein Rückstand von 18 g rohem 3,3-Äthylenedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-dimethoxypropyl)-4,6,15-androstatrien als Öl erhalten.
- c) 18 g 3,3-Äthylenedioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-dimethoxypropyl)-4,6,15-androstatrien werden in 500 ml Aceton unter Eiskühlung mit 1,0 g p-Toluolsulfonsäure versetzt und 15 Minuten unter Kühlung nachgerührt. Die Reaktionslösung wird in natrium-

909816/0410

- 15 -



2746298

hydrogencarbonathaltiges Eiswasser eingerührt, der Niederschlag abfiltriert, gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen werden 15,5 g 3-Oxo-4,6,15-androstatrien-[17-( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2 $\xi$ -methylläther als Öl erhalten.

- d) 15,5 g 3-Oxo-4,6,15-androstatrien-[17-( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2 $\xi$ -methylläther werden in 350 ml Aceton unter Eiskühlung mit 35 ml Chromschwefelsäure (hergestellt aus 267 g Chrom(VI)-oxyd, 400 ml Wasser und 230 ml konzentrierter Schwefelsäure, mit Wasser zu 1 Liter aufgefüllt) versetzt und 30 Minuten unter Eisbadkühlung nachgerührt. Dann wird in Eiswasser eingerührt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wird der Rückstand an Silicagel chromatographiert. Es werden 9,8 g 3-Oxo-4,6,15-androstatrien-[17-( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on vom Schmelzpunkt 182 - 185° C.
- e) 1,5 g 3-Oxo-4,6,15-androstatrien-[17-( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on werden in 22,5 ml Methanol mit 1,5 ml Thioessigsäure 2 Stunden am Rückfluß erhitzt. Es wird dann mit Äther verdünnt, mit Wasser, Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Silicagel chromatographiert. Es werden 1,05 g 7 $\alpha$ -Acetylthio-3-oxo-4,15-androstadien-[17-( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on vom Schmelzpunkt 317 - 319° C (Zersetzung) erhalten.

909816/0410

- 16 -

Beispiel 2

- a) 20 g 3,3-Äthylendioxy-4,6,15-androstatrien-17-on werden in 280 ml absolutem Tetrahydrofuran mit 4,34 g frisch gepreßtem Lithium versetzt. Dann werden unter Eiskühlung 36 ml 1-Brom-3-propanol-tetrahydropyranyläther innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach 1,5 Stunden Rühren bei Eisbadtemperatur wird vom nicht umgesetzten Lithium abfiltriert und das Filtrat in Eiswasser eingerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen.

Nach dem Trocknen und Eindampfen wird ein Rückstand von 17 g rohem 3,3-Äthylendioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3-tetrahydropyranyloxy-propyl)-4,6,15-androstatrien als Öl erhalten.

- b) 5 g 3,3-Äthylendioxy-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3-tetrahydropyranyloxy-propyl)-4,6,15-androstatrien werden in 120 ml Äthanol gelöst, mit 1 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die beim Einrühren in Wasser erhaltene Ausfällung wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und durch chromatographie an Silicagel gereinigt. 1,5 g 17 $\beta$ -Hydroxy-17 $\alpha$ -(3-hydroxy-propyl)-4,6,15-androstatrien-3-on.
- c) 1,5 g 17 $\beta$ -Hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-hydroxypropyl)-4,6,15-androstatrien-3-on werden in 22,5 ml Methanol mit 1,5 ml Thioessigsäure 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Es wird dann mit Äther verdünnt, mit Wasser, Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an

909816/0410

- 17 -

Silicagel chromatographiert. Es werden 1,0 g 7 $\alpha$ -Acetylthio-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-hydroxypropyl)-4,15-androstadien-3-on vom Schmelzpunkt 138 - 140° C erhalten.

### Beispiel 3

- a) 4,5 g 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,6-androstadien-3,17-dion werden in 25 ml Methylenchlorid mit 15 ml Äthylenglykol, 20 ml o-Ameisensäuretriäthylester und 150 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und 75 Minuten bei 50° C gerührt. Nach Zusatz von 1,5 ml Pyridin wird die Reaktionslösung mit Äther verdünnt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird über eine Kieselgelsäule chromatographiert und man erhält das 3,3-Äthylendioxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4,6-androstadien-17-on als Rohprodukt.
- b) 5 g 3,3-Äthylendioxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4,6-androstadien-17-on werden in 70 ml absolutem Tetrahydrofuran mit 1,1 g frisch gepreßtem Lithium versetzt. Dann werden unter Eiskühlung 9 ml 1-Brom-3-dimethoxypropan innerhalb von 20 Minuten zugetropft. Nach 1,5 Stunden Rühren bei Eisbadtemperatur wird vom nicht umgesetzten Lithium abfiltriert und das Filtrat in Eiswasser eingerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wird ein Rückstand von 4 g rohem 3,3-Äthylendioxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-dimethoxypropyl)-4,6-androstadien als Öl erhalten.

909816/0410

- 18 -

2746298

- c) 4 g 3,3-Äthylendioxy-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-17 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -(3'-dimethoxypropyl)-4,6-androstadien werden in 100 ml Aceton unter Eiskühlung mit 200 mg p-Toluolsulfonsäure versetzt und 15 Minuten unter Kühlung nachgerührt. Die Reaktionslösung wird in natriumhydrogenkarbonathaltiges Eiswasser eingerührt, der Niederschlag abfiltriert, gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen werden 3,5 g 3-Oxo-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4,6-androstadien-[17 $\beta$ ( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-methyläther als Öl erhalten.
- d) 3,5 g 3-Oxo-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-4,6-androstadien-[17 $\beta$ ( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydro-furan-2'-methyläther werden in 70 ml Aceton unter Eiskühlung mit 35 ml Chromschwefelsäure (hergestellt aus 267 g Chromtrioxid, 400 ml Wasser und 230 ml konzentrierter Schwefelsäure, mit Wasser zu 1 Liter aufgefüllt) versetzt und 30 Minuten unter Eisbadkühlung nachgerührt. Dann wird in Eiswasser eingerührt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wird der Rückstand an Silicagel chromatographiert. Man erhält das 3-Oxo-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-4,6-androstadien-[17 $\beta$ -( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on als Öl.
- e) 1,0 g 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -Methylen-3-oxo-4,6-androstadien-[17( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on werden in 15 ml Methanol mit 1 ml Thioessigsäure 2 Stunden am Rückfluß erhitzt. Es wird dann in Äther aufgenommen, mit Natriumhydrogenkarbonatlösung

909816/0410

- 19 -

2746298

und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird an Silicagel chromatographiert. Es werden aus Diisopropyläther/Aceton umkristallisiert 590 mg 7 $\alpha$ -Acetylthio-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -methylen-3-oxo-4-androsten-[17( $\beta$ -1')-spiro-5']-perhydrofuran-2'-on vom Schmelzpunkt 242 - 247° C (Zersetzung) erhalten.

809816/0410

Vorstand: Dr. Herbert Asmis · Dr. Christian Bruhn · Hans-Jürgen Hamann  
Dr. Heinz Hannse · Karl Otto Mittelstentscheid · Dr. Horst Witzel  
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Dr. Eduard v. Schwartzkoppen  
Sitz der Gesellschaft: Berlin und Bergkamen  
Handelsregister: AG Charlottenburg 93 HRB 283 u. AG Kamen HRB 0061

Postanschrift: SCHERING AG · D-1 Berlin 65 · Postfach 65 03 11  
Postcheck-Konto: Berlin-West 1175-101, Bankleitzahl 100 100 10  
Berliner Commerzbank AG, Berlin, Konto-Nr. 108 7006 00, Bankleitzahl 100 400 00  
Berliner Disconto-Bank AG, Berlin, Konto-Nr. 241/5008, Bankleitzahl 100 700 00  
Berliner Handels-Gesellschaft — Frankfurter Bank —, Berlin,  
Konto-Nr. 14-362, Bankleitzahl 100 202 00